



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή εργασία:

Μελέτη των γονιδίων AID και CD40 σε ασθενείς με
αντισωματικές ανεπάρκειες

Νικόλαος Πουλής

ΛΑΡΙΣΑ, 2015

**Μελέτη των γονιδίων AID και CD40 σε ασθενείς με
αντισωματικές ανεπάρκειες**

**Study of the genes AID and CD40 in patients with
antibody deficiencies**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)	Καθηγητής φυσιολογίας ζωικών οργανισμών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ	Καθηγητής εργαστηριακής ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΣΠΕΛΕΤΑΣ ΜΑΤΘΑΙΟΣ	Αναπληρωτής καθηγητής εργαστηριακής ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του καθηγητή φυσιολογίας ζωικών οργανισμών Κουρέτα Δημητρίου τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα. Επίσης θερμές ευχαριστίες οφείλω στους συνεπιβλέποντες καθηγητές Γερμενή Αναστάσιο και Σπελέτα Ματθαίο από το τμήμα της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η παρούσα εργασία αυτή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, του οποίου τα μέλη με βοήθησαν με κάθε προθυμία και τους ευχαριστώ και πιο συγκεκριμένα την Εύα Γραμουστιάνου για την βοήθεια και την καθοδήγησή της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	7
1.2 Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	7
1.3 ΩΡΙΜΑΝΣΗ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	8
1.4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	10
1.5 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΕΝΤΡΑ	10
1.6 ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	12
(Somatic Hypermutation, SHM).....	12
1.7 ΜΕΤΑΠΤΩΣΗ ΤΑΞΗΣ	13
(CLASS SWITCH RECOMBINATION, CSR).....	13
1.8 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ AID	14
1.9 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ CD40	16
1.10 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ AID/CD40.....	17
1.10.1 AID	17
1.10.2 CD40	17
1.11 ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΥΠΕΡ-IgM.....	18
1.12 ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	19
1.13 ΥΠΟΘΕΣΗ.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ	21
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	21
2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ	23
2.3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ PCR.....	23
2.3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	24
2.3.3 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΒΑΣΕΩΝ (sequencing)	25
2.3.4 ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΠΕΨΗ NcoI (RFLP).....	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
3.1 AID	26
3.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ AID	26
3.3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ CD40	28
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	31
4.1 AID	31
4.2 CD40	32
5. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ.....	33
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	33

ABSTRACT

B lymphocytes are the cell type that protect the human organism from harmful microorganisms. Sometimes, there are dysfunctions especially of the genetic factors that are in charge of the correct function of the Immune system. In this study we examined in patients with one of the most important deficiencies of the immune system, CVID (Common Variable Immunodeficiency), whether they are carrying mutations or polymorphisms for genes AID and CD40. These genes are responsible for immunodeficiencies that characterise the Hyper-IgM syndromes type 2 and 3, respectively. The target of this study is the more efficient categorisation and diagnosis of the patients and the partial understanding of CVID's mechanism. In total, 5 and 8 patients were tested for AID and CD40 accordingly. We found 3 polymorphisms (rs1883832, rs11046349, rs2518144), which have been co-related with many pathological situations from which the most important is the one that CD40 has a decrease of its expression, in patients with the specific polymorphism rs1883832.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Β λεμφοκύτταρα αποτελούν τον κυτταρικό τύπο ο οποίος προστατεύει τον οργανισμό από παθογόνους μικροοργανισμούς. Στο ανοσοποιητικό σύστημα, προκαλούνται διάφορες διαταραχές των γενετικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την λειτουργία του. Στην μελέτη αυτή ελέγξαμε στους ασθενείς μίας από τις πιο σημαντικές ανοσοανεπάρκειες, της CVID, για το αν φέρουν μεταλλάξεις για τα γονίδια AID και CD40, τα οποία ελέγχουν τις ανοσοανεπάρκειες Hyper-IgM τύπου 2 και 3. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η καλύτερη κατάταξη και διάγνωση των ασθενών και η εν μέρη αποσαφήνιση του μηχανισμού της CVID, σε σύνολο 5 και 8 ασθενών για τα AID και CD40 αντίστοιχα. Βρήκαμε 3 πολυμορφισμούς (rs1883832, rs11046349, rs2518144), οι οποίοι έχουν συσχετισθεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις με σημαντικότερη δε αυτή που προκαλεί την μειωμένη έκφραση του CD40 σε ασθενείς με τον πολυμορφισμό rs1883832.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι το σύστημα με το οποίο ο οργανισμός προφυλάσσεται από μολύνσεις παθογόνων μικροοργανισμών και ιών ενώ καταστρέφει μολυσμένα κύτταρα του οργανισμού. Το σύστημα αυτό έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται εναντίον κάθε διαφορετικού παθογόνου παράγοντα. Πολλές φορές όμως παρουσιάζει κάποιες διαταραχές στην λειτουργία του που οδηγούν τον οργανισμό σε παθολογικές καταστάσεις. Το ρεπερτόριο των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος είναι πολύ μεγάλο. Στην μελέτη αυτή εστιάζουμε στις διαταραχές εκείνες οι οποίες προκαλούν την έλλειψη των λειτουργιών των Β λεμφοκυττάρων.

1.2 Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Η αναπτυξιακή πορεία μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η παραγωγή πλασματοκυττάρων και Β κυττάρων μνήμης διαιρείται σε δύο κύρια στάδια: 1 παραγωγή ώριμων, ανοσοδραστικών Β κυττάρων (ωρίμανση), 2 ενεργοποίηση των ώριμων Β κυττάρων όταν αλληλεπιδράσουν με ένα αντιγόνο και την διαφοροποίηση των ενεργοποιημένων Β κυττάρων προς πλασματοκύτταρα και Β κύτταρα μνήμης. Σε πολλά θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου και του ποντικού τα Β κύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών. Η διαδικασία αυτή αποτελεί φυσικό επακόλουθο των αναδιατάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και εξελίσσεται με την απουσία αντιγόνου. Η φάση αυτή αποτελεί την αντιγονοανεξάρτητη φάση της ανάπτυξης των Β κυττάρων.

Ένα ανώριμο Β κύτταρο παράγει μόνο IgM. Για το λόγο αυτό εγκαταλείπει τον μυελό των οστών, προκειμένου να εκφράσει τόσο μεμβρανική IgM αλλά και μεμβρανική IgD με συγκεκριμένη αντιγονική ειδικότητα. Αυτά τα παρθένα Β κύτταρα (naive B cells), τα οποία δεν έχουν έρθει σε επαφή με κάποιο αντιγόνο κυκλοφορούν ελεύθερα στο αίμα και στην λέμφο και μεταφέρονται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, με πιο σημαντικούς προορισμούς, τους λεμφαδένες και τον σπλήνα. Αν ένα Β κύτταρο ενεργοποιηθεί με επαφή, με ένα αντιγόνο, το οποίο προσδένεται στο μεμβρανικό αντίσωμα, εγείρει το Β κύτταρο ώστε να πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται έτσι ώστε να παράγει έναν πληθυσμό πλασματοκυττάρων, τα

οποία εκκρίνουν αντισώματα, και ένα πληθυσμό B κυττάρων μνήμης. Λόγω αυτής της ενεργοποίησης και καθώς η απόκριση εξελίσσεται, μερικά B κύτταρα υφίστανται την ωρίμανση συγγένειας (affinity maturation), δηλαδή μια προοδευτική αύξηση της μέσης συγγένειας των αντισωμάτων που παράγονται.

Επίσης πολλά από αυτά υφίστανται μετάπτωση τάξης (class switching), δηλαδή αλλαγή του ισοτύπου του αντισώματος που παράγεται από το B κύτταρο, από μ σε γ, α ή ε. Από την στιγμή που η ενεργοποίηση και η διαφοροποίηση των B κυττάρων στην περιφέρεια, απαιτεί την παρουσία αντιγόνου, το στάδιο αυτό αποτελεί την αντιγονοεξαρτώμενη φάση της ανάπτυξης τους. Κατά την διάρκειά της ενήλικου ζωής παράγονται στον μυελό των οστών πολλά B κύτταρα, από τα οποία, όμως, τελικά ωριμάζουν πολύ λίγα.

Ο αριθμός των κυκλοφορούντων B κυττάρων ανέρχεται στο 10% των συνολικών κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων. Τα περισσότερα από αυτά είναι παρθένα B κύτταρα, με μικρή διάρκεια ζωής. Αυτό συμβαίνει αν αποτύχουν να έλθουν σε επαφή με κάποιο αντιγόνο. Τα B κύτταρα συναγωνίζονται για την επαφή αυτή καθώς επιδιώκουν να εγκατασταθούν σε λεμφικό περιβάλλον που υποστηρίζει την επιβίωσή τους.

Το ανοσοποιητικό σύστημα διαθέτει την ικανότητα παραγωγής 10^{10} αντισωμάτων, προφανώς όμως ένα μικρό κλάσμα αυτού του δυναμικού παρουσιάζεται κάθε στιγμή από τις μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες των κυκλοφορούντων B κυττάρων. Μελέτες μεγάλους δείγματος σπονδυλωτών έχουν δείξει ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλία οδών και επιδράσεων αυτών στην ανάπτυξη των B κυττάρων.

1.3 ΩΡΙΜΑΝΣΗ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η παραγωγή ώριμων B κυττάρων συμβαίνει αρχικά στα εμβρυϊκά στάδια και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Πριν την γέννηση, οι σημαντικότερες θέσεις ωρίμανσης των B κυττάρων είναι ο λεκιθικός σάκος, το εμβρυϊκό ήπαρ και ο μυελός των οστών ενώ μετά την γέννηση η παραγωγή ώριμων B κυττάρων γίνεται στον μυελό των οστών. Η ανάπτυξη των B κυττάρων ξεκινά καθώς λεμφοειδή στελεχιαία κύτταρα διαφοροποιούνται προς την ανοσολογικά διακριτή κυτταρική σειρά των πιο πρώιμων B κυττάρων, των προγονικών B κυττάρων (progenitor B cells, pro B-cells). Ο πολλαπλασιασμός των προγονικών B κυττάρων προς πρόδρομα B ή

προ B κύτταρα (precursor B cells, pre-B cells), απαιτεί την ύπαρξη ενός μικρο-περιβάλλοντος που παρέχουν τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Τα στρωματικά κύτταρα παίζουν δύο σημαντικούς ρόλους: αλληλεπιδρούν άμεσα με τα προγονικά B και τα προ-B κύτταρα και εκκρίνουν διάφορες κυτταροκίνες, με πιο σημαντική την IL-7, οι οποίες υποστηρίζουν την αναπτυξιακή διαδικασία. Κατά το προτιμότερο αναπτυξιακό στάδιο, τα B κύτταρα χρειάζονται την άμεση επαφή με τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των

οστών. Αυτού του είδους η αλληλεπίδραση ρυθμίζεται με μία σειρά μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (CAMs, Cell Adhesion Molecules). Μετά την επίτευξη της αρχικής επαφής, λαμβάνει χώρα η αλληλεπίδραση ενός υποδοχέα των προγονικών κυττάρων, που ονομάζεται c-kit, με ένα επιφανειακό μόριο των στρωματικών κυττάρων, που είναι γνωστό ως επιφανειακός παράγοντας των στελεχιαίων κυττάρων (stem cell factor).

Η εν λόγω αλληλεπίδραση ωθεί το προγονικό B κύτταρο στην διαίρεση και την διαφοροποίησή του προς προ-B κύτταρο. Η IL-7 παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτό το στάδιο επιλογής καθώς αποτελεί σηματοδοτικό μόριο για τα προ-B κύτταρα προκειμένου να μειώσουν την παραγωγή των CAMs (Cell Adhesion Molecules) και να αρχίσει η αποκόλληση των διαιρούμενων κυττάρων. Επίσης η IL-7 αποτελεί το πλέον απαραίτητο μόριο για την αύξηση και την διαφοροποίησή τους.

Η ωρίμανση των B κυττάρων εξαρτάται από την αναδιάταξη του ανοσοσφαιρινικού DNA των λεμφοειδών στελεχιαίων κυττάρων. Στο στάδιο των B προγονικών κυττάρων, αρχικά συμβαίνει μια αναδιάταξη των γονιδιακών τμημάτων D_H με τα τμήματα J_H των βαρέων αλυσίδων, η οποία ακολουθείται από τη σύνδεση ενός V_H τμήματος με το D_HJ_H . Στην περίπτωση που η πρώτη αναδιάταξη είναι μη παραγωγική, η αναδιάταξη $V_H D_H J_H$ συνεχίζει στο άλλο χρωμόσωμα. Μετά την ολοκλήρωση των αναδιατάξεων της βαριάς αλυσίδας, το κύτταρο είναι πλέον προ-B κύτταρο. Στην συνέχεια, η ανάπτυξη ενός προ-B κυττάρου προς την κατεύθυνση των ανώριμων B

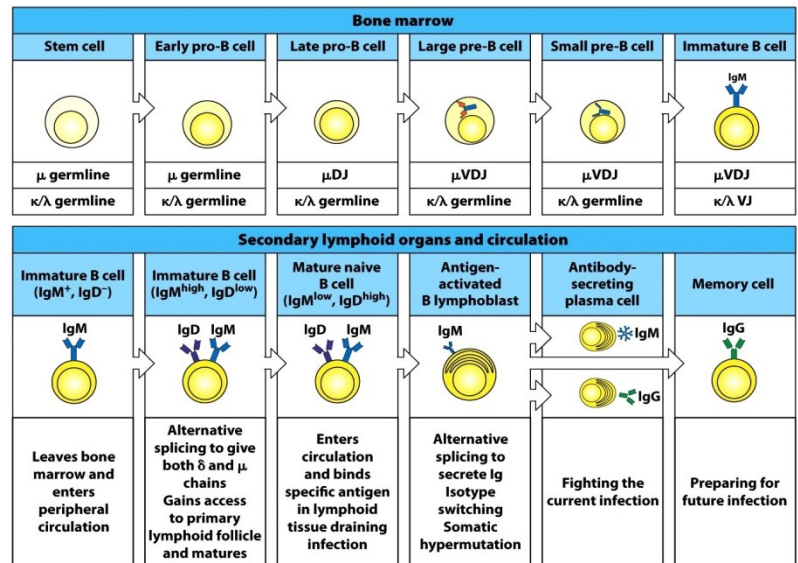


Figure 6.25 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

Εικόνα 1: Τα στάδια ωρίμανσης των B κυττάρων και σε ποιά όργανα πραγματοποιούνται. Τα B κύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών και μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα (Garland Science 2009, The immune system, 3 ed).

κυττάρων προϋποθέτει μία παραγωγική αναδιάταξη του γονιδίου της ελαφριάς αλυσίδας. Εξαιτίας του αλληλόμορφου αποκλεισμού, στην επιφάνεια ενός B κυττάρου εμφανίζεται μόνο ένας ισότυπος ελαφριάς αλυσίδας. Η αναδιάταξη μίας ελαφριάς αλυσίδας όταν είναι παραγωγική και έχει ολοκληρωθεί, οδηγεί στην δέσμευση του ανώριμου πλέον B κύτταρου για μια συγκεκριμένη αντιγονική ειδικότητα, η οποία καθορίζεται από τις ακολουθίες των VDJ της βαριάς και DJ της ελαφριάς αλυσίδας.

1.4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

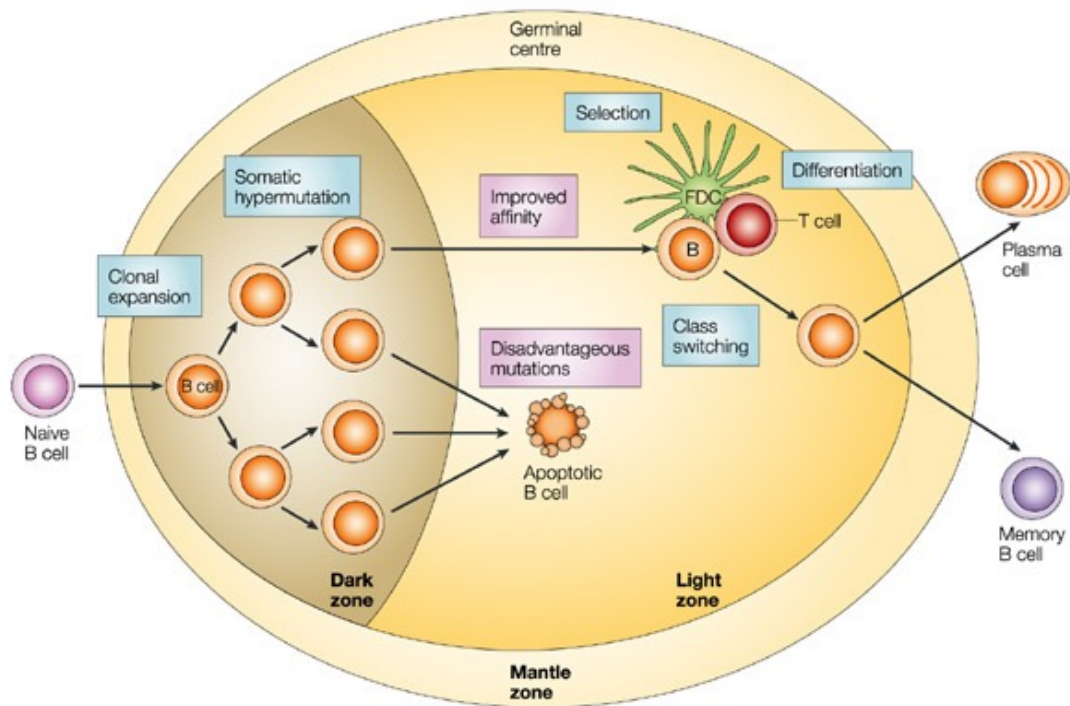
Μετά την έξοδο των κυττάρων από τον μυελό των οστών λαμβάνει χώρα στην περιφέρεια η ενεργοποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση, ως απόκριση στην παρουσία του αντιγόνου. Η ενεργοποίηση και η κλωνική επιλογή των παρθένων B κυττάρων, που κατευθύνεται από ένα αντιγόνο, οδηγεί στην παραγωγή πλασματοκυττάρων και B κυττάρων μνήμης. Στην απουσία αντιγονοεπαγόμενης ενεργοποίησης, τα παρθένα B κύτταρα της περιφέρειας έχουν μικρή διάρκεια ζωής, πεθαίνοντας μέσα σε λίγες εβδομάδες με απόπτωση.

Οι περισσότερες αποκρίσεις έναντι των περισσότερων αντιγόνων απαιτεί την ύπαρξη του θύμου (θυμο-εξαρτώμενα αντιγόνα, Thymus dependent, TD antigens). Ωστόσο μερικοί τύποι αντιγόνων επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων ακόμα και απουσία του θύμου αδένος. Η απόκριση των B κυττάρων σε θύμο-εξαρτώμενα αντιγόνα, προϋποθέτει την άμεση επαφή με τα T_H κύτταρα και όχι απλά την έκθεσή τους στις κυτταροκίνες που παράγουν τα T_H κύτταρα (Kuby Immunology, 2012). Στην αντίθετη ακριβώς περίπτωση κατατάσσονται τα θυμο-ανεξάρτητα αντιγόνα.

1.5 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΕΝΤΡΑ

Τα βλαστικά κέντρα (Germinal Centers, GC) δημιουργούνται εντός 7-10 ημερών από την αρχική έκθεση σε ένα θυμο-εξαρτώμενο αντιγόνο. Λαμβάνουν χώρα τρία σημαντικά γεγονότα που αφορούν την διαφοροποίηση των B κυττάρων: η ωρίμανση συγγένειας, η μετάπτωση τάξης και η δημιουργία των κυττάρων μνήμης και πλασματοκυττάρων.

Η ωρίμανση συγγένειας και η δημιουργία κυττάρων μνήμης απαιτούν την ύπαρξη των βλαστικών κέντρων. Ωστόσο είναι πιθανό ένα ποσοστό της μετάπτωσης τάξης να συμβαίνει και εκτός βλαστικών κέντρων. Κατά τα αρχικά στάδια του σχηματισμού του βλαστικού κέντρου, τα ενεργοποιημένα B



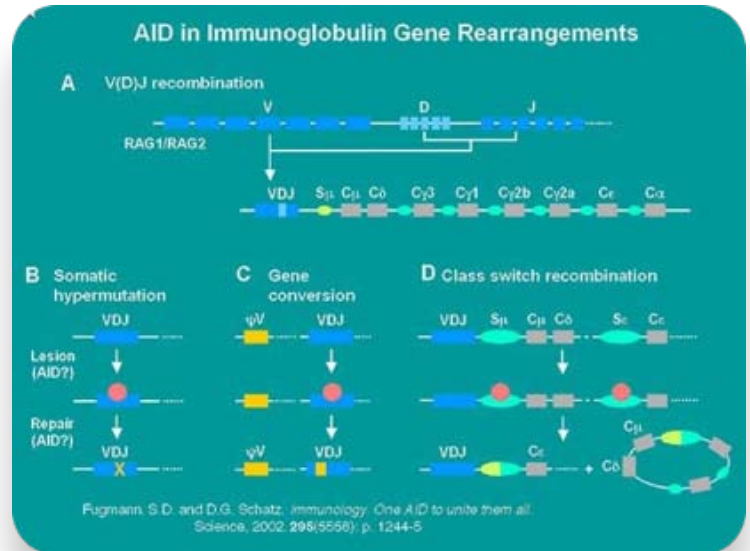
Nature Reviews | Immunology

Εικόνα 2: Δομή των βλάστικών κέντρων (Germinal Centers, GCs). Στα βλαστικά κέντρα εμφανίζονται δύο ζώνες η σκοτεινή και η φωτεινή, όπου συμβαίνει το SHM και το CSR αντίστοιχα (Nature reviews, Immunology).

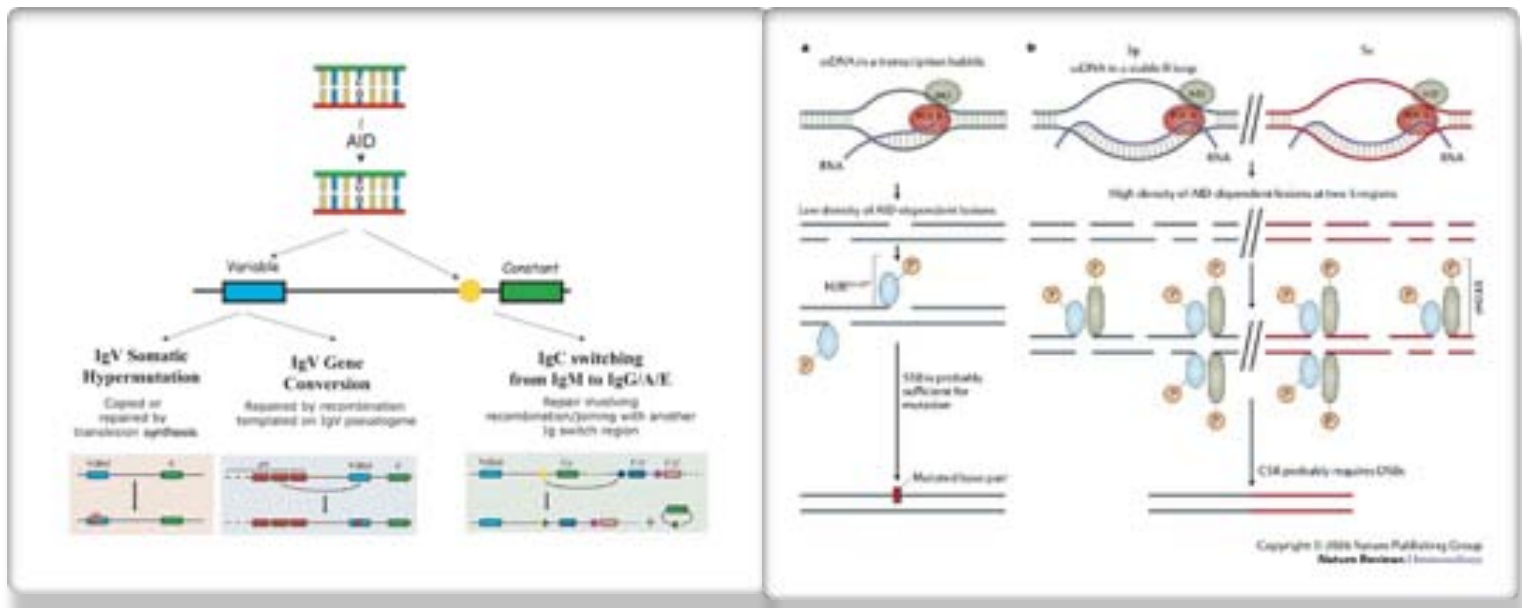
κύτταρα υφίστανται έντονο πολλαπλασιασμό. Αυτά τα κύτταρα που υφίστανται πολλαπλασιασμό σχηματίζουν μια εύκολα διακριτή ζώνη που ονομάζεται σκοτεινή ζώνη. Τα ενεργοποιημένα κύτταρα ονομάζονται κεντροβλάστες και είναι αυτά που υπόκεινται σε έντονο πολλαπλασιασμό και διακρίνονται για το μεγάλο μέγεθός τους, την διάχυτη χρωματίνη, και την πλήρη ή σχεδόν πλήρη απουσία των επιφανειακών παραγόντων Ig. Από τους κεντροβλάστες παράγονται τα κεντροκύτταρα τα οποία σε αντίθεση με τους κεντροβλάστες παράγουν επιφανειακή Ig, μετακινούνται από την σκοτεινή ζώνη σε μία ζώνη η οποία περιέχει θυλακιακά δένδριτικά κύτταρα και ονομάζεται φωτεινή ζώνη. Σε αυτήν την περιοχή κάποια κεντροκύτταρα έρχονται σε επαφή με το αντιγόνο, το οποίο παρουσιάζεται με την μορφή συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος στην επιφάνεια των θυλακιακών κυττάρων.

1.6 ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΗ (Somatic Hypermutation, SHM)

Ο έλεγχος των γονιδίων των αντισωμάτων κατά τη διάρκεια μίας ανοσολογικής απόκρισης, δείχνει ότι στα B κύτταρα των βλαστικών κέντρων συμβαίνει εκτεταμένη μετάλλαξη των Ig γονιδίων, που αποκρίνονται στη μόλυνση. Μια άμεση απόδειξη του γεγονότος ότι στα βλαστικά κέντρα συμβαίνει η σωματική υπερμετάλλαξη, αποτελεί το γεγονός ότι η συχνότητα μεταλλάξεων στα B κύτταρα τα οποία προέρχονται από τα βλαστικά κέντρα, είναι μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα B κύτταρα που προέρχονται από τις υπόλοιπες περιοχές ενεργοποίησης των B κυττάρων. Στα B κύτταρα των βλαστικών κέντρων υπάρχουν πολλές μεταλλάξεις στα γονίδια ανοσοσφαιρινών σε αντίθεση με εκείνα τα οποία προέρχονται από περιοχές ενεργοποίησης εκτός βλαστικών κέντρων. Η συντριπτική πλειοψηφία αυτών των μεταλλάξεων βρίσκεται στην VDJ περιοχή των αναδιαταγμένων γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Αν και η διαδικασία της υπερμετάλλαξης προκαλεί μεταλλάξεις σε όλη την περιοχή της V περιοχής, η επιλογή που κατευθύνεται από το αντιγόνο έχει ως αποτέλεσμα την τελική επικράτηση των ανοσοσφαιρινικών γονιδίων, στα οποία η πλειοψηφία των μεταλλάξεων εντοπίζεται στις τρεις συμπληρωματικές περιοχές CDRs. Υπολογίζεται ότι η συχνότητα μετάλλαξης κατά τη διάρκεια της σωματικής υπερμετάλλαξης είναι περίπου 10⁻³ ζ.β./διαίρεση, η οποία είναι μεγαλύτερη κατά 1000 φορές από τον φυσιολογικό ρυθμό μεταλλάξεων. Το τμήμα VDJ η VJ έχει μήκος 700 βάσεις, επομένως περίπου σε δύο κυτταρικές διαιρέσεις υπάρχει μια μετάλλαξη και ένας ανασυνδιασμένος κεντροβλάστης με μεταλλάξεις στις μεταβλητές περιοχές είτε των βαρέων είτε των ελαφριών αλυσίδων. Το γεγονός ότι στα GCs εμφανίζονται πολύ μεγάλες συχνότητες μεταλλάξεων και το γεγονός ότι είναι στοχευμένες σε συγκεκριμένες περιοχές γονιδίων αποτελεί το σημείο ελέγχου αυτής της τόσο λεπτής διαδικασίας (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Η διαδικασία της σωματικής υπερμετάλλαξης συμβαίνει στα βλαστικά κέντρα στα ενεργοποιημένα B κύτταρα. Κατά την διάρκεια του SHM οι V περιοχές των ελαφριών περιοχών υφίστανται μεταλλάξεις από το AID και στην συνέχεια ανασυνδυάζονται (Fugmann S.D. Science 2002).



Σχήμα 1: Οι διαδικασίες κατά τις οποίες ανασυνδυάζονται οι C περιοχές και υφίστανται μεταλλάξεις τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών κατά τις διαδικασίες SHM και CSR (2006, Nature Immunology)

Το ένζυμο που ευθύνεται για την σωματική υπερμετάλλαξη είναι μία επαγόμενη μετά από ενεργοποίηση απαμινάση της κυτιδίνης (Activation Induced Cytidine DeAminase, AICDA). Το ένζυμο αυτό προκαλεί μεταλλάξεις στοχευμένα με σκοπό την παραγωγή κυτάρων τα οποία θα έχουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας και άλλων με χαμηλότερης από αυτά συγγένειας. Ως εκ τούτου επιλέγονται μόνο τα κύτταρα με υποδοχείς υψηλής συγγένειας για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Τα κύτταρα αυτά επιλέγονται θετικά και οδηγούνται στη φωτεινή ζώνη για να προχωρήσουν στη μετέπειτα διαδικασία ωρίμανσης.

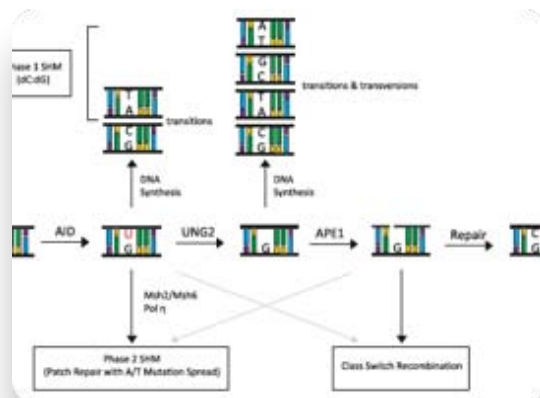
1.7 ΜΕΤΑΠΤΩΣΗ ΤΑΞΗΣ (CLASS SWITCH RECOMBINATION, CSR)

Οι ανοσοσφαιρίνες πραγματοποιούν δύο σημαντικές λειτουργίες. Κατά πρώτον την ειδική δέσμευση ενός αντιγόνου, η οποία καθορίζεται από τις περιοχές V_H και V_L και κατά δεύτερον την συμμετοχή τους στις υπόλοιπες βιολογικές λειτουργίες, η οποία καθορίζεται από τον ισότυπο της σταθερής βαριάς αλυσίδας.

Αμέσως μετά την αντιγονική διέγερση ενός B κυτάρου το DNA της βαριάς αλυσίδας μπορεί να υποστεί περαιτέρω αναδιάταξη στην οποία κάθε $V_H D_H J_H$ μπορεί να ανασυνδυαστεί με κάθε C_H τμήμα γονιδίου. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται Μετάπτωση τάξης (Class Switch Recombination) και κατά την διάρκεια αυτού παρεμβάλλονται βραχείες περιοχές του DNA, που είναι γνωστές ως περιοχές μετάπτωσης. Οι τελευταίες εντοπίζονται 2-3 kb πριν από

τις περιοχές C_H , εκτός από την C_{δ} , είναι μεγάλες και αποτελούνται από μικρές επαναλαμβανόμενες περιοχές (Kuby Immunology, 2012).

Διάφορες κυτταροκίνες δρουν ως παράγοντες μετάπτωσης που επηρεάζουν ποιος θα είναι ο τύπος της ανοσοσφαιρίνης που θα παραχθεί από την μετάπτωση τάξης. Παράδειγμα αποτελεί η IL-4 που επάγει τη μετάπτωση τάξης από C_{μ} σε $C_{\gamma 1}$ ή C_{ϵ} . Η βιολογική σημασία των ανοσοσφαιρινών μεταβάλλεται με τον ανασυνδυασμό των βαρέων αλυσίδων ενώ η συγγένεια προς ένα συγκεκριμένο αντιγόνο παραμένει σταθερή. Η αρχική ανοσοσφαιρίνη που παράγεται και υφίσταται όλους τους ανασυνδυασμούς της μετάπτωσης τάξης είναι η IgM και από αυτήν παράγονται όλοι οι υπόλοιποι ισότυποι των ανοσοσφαιρινών. Στην περίπτωση των θυμο-εξαρτώμενων αντιγόνων, η μεμβρανική αλληλεπίδραση μεταξύ του CD40 του B κυττάρου και του CD40L του T κυττάρου αποτελεί το σήμα για την μεταστροφή τάξης. Έτσι τα γονίδια CD40L και CD40 αποτελούν βασικό σημείο ελέγχου της διαδικασίας της μετάπτωσης τάξης¹¹.

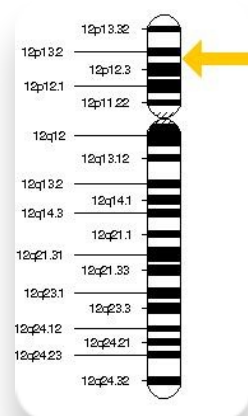


Εικόνα 4α: Ο μηχανισμός με τον οποίο το AID προκαλεί τις θραύσεις στο DNA των ανοσοσφαιρινών (Keim et al, 2013)

1.8 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ AID

Το AID αποτελεί το βασικό γονίδιο για την σωματική υπερμετάλλαξη και την μετάπτωση τάξης και παράγει το ένζυμο AICDA. Το AID αρχικά εντοπίζεται στο 12ο χρωμόσωμα στην θέση p13 και αποτελείται από 5 εξόνια (Εικόνα 4β) (Mirjam van den Burg, 2011). Το γονίδιο αυτό υπό φυσιολογικές συνθήκες εκφράζεται στα ενεργοποιημένα από αντιγόνο B κύτταρα. Τα B κύτταρα αυτά όταν ενεργοποιούνται μετατοπίζονται στα

GCs, όπου υφίστανται τη διαδικασία υπερμετάλλαξης και μετάπτωσης τάξης (Kuby Immunology, 2012). Τις διαδικασίες αυτές διεκπεραιώνει το AID, το οποίο έχει ως βασική λειτουργία την παραγωγή ανασυνδυασμένων γονιδίων ανοσοσφαιρινών (Εικόνα 4α). Πιο συγκεκριμένα το AID προκαλεί μεταλλάξεις με συγκεκριμένο μηχανισμό και προκαλεί αναδιατάξεις στο DNA των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών¹⁰ (Εικόνα 4γ). Φυσικά δεν αναλαμβάνει όλες τις διαδικασίες χωρίς την βοήθεια άλλων ενζύμων τα

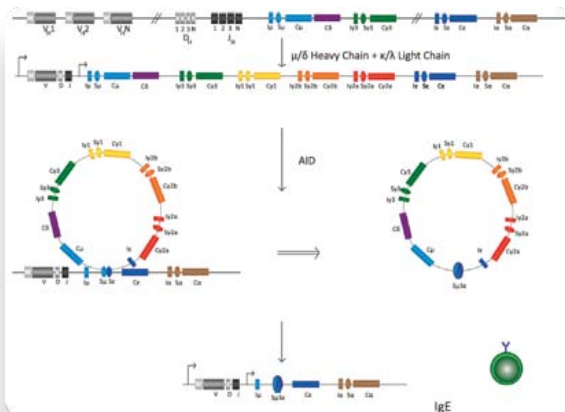


Εικόνα 4β

οποία έχουν συμπληρωματικές λειτουργίες όπως το UNG2 και το APE1.

Όπως δηλώνεται στο όνομά του, το AICDA (activation induced cytidine deaminase), είναι μία απαμινάση της κυτιδίνης. Αρχικά το ένζυμο αναγνωρίζει τις περιοχές του DNA των ανοσοσφαιρινών στις οποίες πρόκειται να προκαλέσει τις μεταλλάξεις. Έπειτα αφαιρεί την αμινική ομάδα από τις κυτοσίνες του DNA των περιοχών αυτών και έτσι οδηγεί στην μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη. Αυτό είναι το πρώτο στάδιο της διαδικασίας το οποίο συμβαίνει στις δύο έλικες του DNA¹⁰. Το επόμενο στάδιο αναλαμβάνουν τα επιδιορθωτικά ένζυμα τα οποία είτε διορθώνουν την μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη είτε παρακάμπτουν την διόρθωση.

Το αποτέλεσμα των δύο επιλογών ελέγχεται από την ρύθμιση των συμπληρωματικών γονιδίων UNG2 και APE1. Συγκεκριμένα στην περίπτωση που η επιδιόρθωση της βλάβης δεν πραγματοποιηθεί, τα γονίδια UNG2 και APE1 είναι ανενεργά και το κύτταρο διαιρείται φέροντας πλέον την μετάλλαξη (U/T στη θέση C/G) και έτσι όλες οι μεταλλάξεις στο γονίδιο προκαλούν την παραγωγή ενός πεπτιδίου πολύ διαφορετικού από το αρχικό. Αυτό συμβαίνει κατά την διαδικασία της σωματικής υπερμετάλλαξης SHM, όπου τα πεπτίδια



Εικόνα 4γ: Ο μηχανισμός με τον οποίο το AID προκαλεί αναδιατάξεις στο DNA των ανοσοσφαιρινών (Keim et al,2013)

που παράγονται στην ουσία διαμορφώνουν τις μεταβλητές περιοχές των μεμβρανικών ανοσοσφαιρινών, προκειμένου να υπάρξουν αντισώματα επιφανειακά τα οποία έχουν υψηλή συγγένεια με το αντιγόνο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κεντροκυττάρων, κυττάρων με επιφανειακά αντισώματα υψηλής συγγένειας, τα οποία αφού επιλέγονται συνεχίζουν την πορεία ενεργοποίησης τους^{5,17}.

Στην περίπτωση που τα επιδιορθωτικά ένζυμα UNG2 και APE1 είναι ενεργά τότε με την σειρά τους επι-

διορθώνουν το DNA. Αρχικά το UNG2 αποκόπτει την U στις περιοχές όπου δεν υπάρχει συμπληρωματικότητα και το APE1 προκαλεί θραύση στον κλώνο εκείνο (Εικόνα 4α). Έτσι όταν η αποκοπή συμβεί σε όλες τις περιοχές εκείνες που έχουν υποστεί την μετάλλαξη, προκαλούνται θραύσεις στο δίκλωνο DNA⁵. Οι θραύσεις αυτές αποτελούν την οδό κατά την οποία ανασυνδυάζονται

οι σταθερές C_H περιοχές των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών κατά την μετάπτωση τάξης CSR (Σχήμα 1).

1.9 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ CD40

Το όνομα του γονιδίου προέρχεται από την συντομογραφία Cluster of Differentiation και ο αριθμός 40 είναι ένας αριθμός ο οποίος αποδόθηκε με βάση την σειρά ανακάλυψής του. Η θέση του γονιδίου είναι στο χρωμόσωμα 20 στην περιοχή q13.12 και αποτελείται από 9 εξόνια. Ανήκει στην οικογένεια TNFSR (Tumor Necrosis Factor Superfamily Receptor, TNFSR21), αποτελεί το 21^ο μέλος της και είναι ένα από τα πιο βασικά μόρια-υποδοχείς των B κυττάρων. Το CD40 είναι ένας μεμβρανικός υποδοχέας των B κυττάρων, του οποίου η λειτουργία ξεκινάει με την επαφή του προσδέτη CD40L ο οποίος παράγεται από τα T λεμφοκύτταρα.

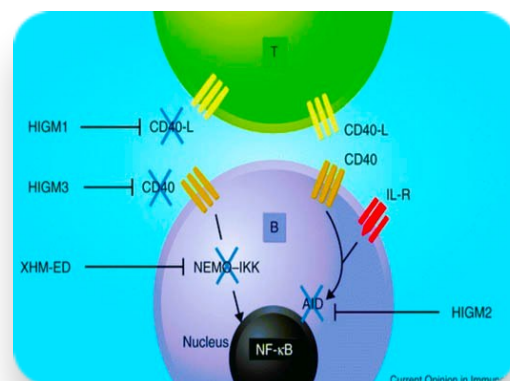
Η σύνδεση του CD40L στο CD40 είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι για μία πληθώρα λειτουργιών των B κυττάρων. Το σήμα, το οποίο δέχεται το ανώριμο B κύτταρο και το ενεργοποιεί, το οδηγεί να εισέλθει στον κυτταρικό κύκλο προκειμένου να πολλαπλασιαστεί και στην συνέχεια να διαφοροποιηθεί σε πλασματοκύτταρα, που παράγουν υψηλής συγγένειας αντισώματα, και σε B κύτταρα μνήμης. Το CD40 ευθύνεται για την δημιουργία των βλαστικών κέντρων στα οποία τα B κύτταρα ωριμάζουν και μέσω της ωρίμανσης υπόκεινται σε CSR και SHM¹¹. Σε συνεργασία με το CD40/CD40L δρα και ο BCR (B cell receptor) ο οποίος ενεργοποιεί τα B κύτταρα με την πρόσδεσή του σε αντιγόνο το οποίο συνήθως είναι μη θυμο-εξαρτώμενο (Εικόνα 5). Είναι βασικό να αναφερθεί επίσης ότι η ενεργοποίηση των B κυττάρων δεν είναι εφικτή χωρίς την διέγερση και των δύο συστημάτων ενεργοποίησης.

Ωστόσο το σύστημα του BCR συμπληρώνεται από το σύστημα BAFF-APRIL. Η ισχυρότερη ενεργοποίηση των B κυττάρων και των υπολοίπων κυττάρων, όπως τα APC, επιτυγχάνεται με την σύνδεση CD40/CD40L¹¹. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω μία από τις βασικότερες λειτουργίες που συμβαίνουν με την πρόσδεση του CD40/CD40L είναι ο σχηματισμός των GCs στα οποία λαμβάνει χώρα στην συνέχεια η σωματική υπερμετάλλαξη και η μετάπτωση τάξης. Αυτό συμβαίνει με την ενεργοποίηση των προ-B κυττάρων τα οποία παράγουν τα CAMs (Cell Adhesion Molecules) που σχηματίζουν συστάδες κυττάρων οι οποίες μετά από την συσσώρευση των κυττάρων αποτελούν τα βλαστικά κέντρα (GCs).

σηματοδοτικά μόρια και μεταγραφικούς παράγοντες, όπως TRAF και NF- κ B, τα οποία αποτελούν βασικούς ρυθμιστικούς παράγοντες τόσο του κυτταρικού κύκλου όσο και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στις διαδικασίες SHM και CSR. Η παντελής έλλειψη του γονιδίου αυτού έχει ως αποτέλεσμα την ανικανότητα παραγωγής βλαστικών κέντρων και την απώλεια της ενεργοποίησης των B κυττάρων από θυμο-εξαρτώμενα αντιγόνα και ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα τα οποία παράγουν CD40L. Σύμφωνα με την κλινική εικόνα των ασθενών αυτών είναι ιδιαίτερος περιεργο, καθώς η τελευταία παραπέμπει σε έλλειψη της ικανότητας των T λεμφοκυττάρων να ενεργοποιήσουν τα B κύτταρα και όχι την ανικανότητα των B κυττάρων να ενεργοποιηθούν από τα T λεμφοκύτταρα.

1.11 ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΥΠΕΡ-IgM

Οι παθολογικές καταστάσεις που περιγράφονται από την έλλειψη των λειτουργιών των γονιδίων που παίρνουν μέρος στην ενεργοποίηση των B κυττάρων έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Ασθενείς οι οποίοι έχουν ελλείψεις σε γονίδια των μηχανισμών τόσο σηματοδότησης της ενεργοποίησης όσο και των μηχανισμών που διεκπεραιώνουν τις διαδικασίες που εγείρονται από την ενεργοποίηση, έχουν κοινή κλινική εικόνα. Μία από τις πιο γνωστές παθολογικές καταστάσεις είναι το σύνδρομο υπεργαμμασφαιριναιμίας M (Hyper-IgM syndrome, HIGM)¹². Έχει προταθεί ότι το σύνδρομο αυτό κατατάσσεται σε μία ευρύτερη κατηγορία ασθενειών, τις πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες (Primary Antibody Deficiencies, PADs). Στις καταστάσεις αυτές γενετικοί κυρίως παράγοντες δεν επιτρέπουν την φυσιολογική παραγωγή κάποιων συγκεκριμένων ισοτύπων και υποτύπων ανοσοσφαιρινών. Στο σύνδρομο Hyper-IgM, η λειτουργία ορισμένων γονιδίων προκαλεί την φυσιολογική παραγωγή ανοσοσφαιρίνης M (IgM) και μη φυσιολογική παραγωγή των υπολοίπων ισοτύπων, είτε αυξημένη είτε μειωμένη. Το HIGM είναι μία ομάδα συνδρόμων η οποία διαιρείται σε 4 υποκατηγορίες. Τα σύνδρομα αυτά είναι τα Υπερ-IgM 1-4. Το κάθε σύνδρομο οφείλεται στην έλλειψη ενός συγκεκριμένου γονιδίου και έχει διαφορετικό φαινότυπο (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Συνολικά εικόνα με τις υποκατηγορίες συνδρόμων HIGM και οι γενετικοί παράγοντες που ευθύνονται γι'αυτά (Current opinion in Immunology, 2009).

Η παθογένεια του AID σε σχέση με την ενεργοποίηση των B κυττάρων, έχει περιγραφεί ως μία παθολογική κλινική κατάσταση γνωστή ως σύνδρομο υπεργασμασφαιριναιμίας M 2 (Hyper-IgM syndrome 2, HIGM2)^{10,17}. Κατά το HIGM2 ο ασθενής παράγει φυσιολογική έως και αυξημένη ποσότητα ανοσφαιρίνης IgM, ενώ έχει ολοκληρωτική απώλεια των ανοσοσφαιρινών IgG, IgE, IgD και IgA και των υποτύπων τους^{3,4}. Αυτό συμβαίνει διότι τα ενεργοποιημένα κύτταρα ως γνωστόν δεν μπορούν να εισέλθουν στην SHM και CSR με αποτέλεσμα οι σταθερές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών να μην ανασυνδυάζονται λόγω έλλειψης του AID με αποτέλεσμα να παράγεται μόνο η μη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που αντιστοιχεί στην IgM.

Το AID έχει μελετηθεί επίσης και σε περιπτώσεις B κυττάρων τα οποία ωριμάζουν εκτός δευτερογενών λεμφικών οργάνων. Στα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκε χαμηλή ικανότητα παραγωγής του AID. Επίσης στην ίδια περίπτωση τα κύτταρα διέρχονταν από τις διαδικασίες SHM και CSR χωρίς να υφίστανται εκτεταμένες μεταλλάξεις στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών¹⁰.

Η παθογένεια του CD40 είναι μία σπάνια κατάσταση και εμφανίζει πολύ έντονο και δριμύ φαινότυπο με ελάχιστες κλινικές περιπτώσεις. Στην κατάσταση αυτή οι ασθενείς παράγουν φυσιολογική έως και αυξημένη ποσότητα IgM αλλά αδυνατούν να παράξουν φυσιολογικά επίπεδα IgA και IgE. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται ως HIGM3⁶. Ωστόσο χαρακτηριστικό των ασθενών αυτών είναι η παραγωγή του CD40L το οποίο παράγεται από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα.

1.12 ΚΟΙΝΗ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (Common Variable Immunodeficiency, CVID) είναι μια ετερογενής ομάδα διαταραχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπογασμασφαιριναιμία, αδυναμία παραγωγής ειδικών αντισωμάτων, υποτροπιάζουσες ή και χρόνιες λοιμώξεις και αυξημένη επίπτωση λεμφοϋπερπλαστικών και κοκκιωματωδών βλαβών, αυτοάνοσων φαινομένων και κακοήθων νοσημάτων. Οι λοιμώξεις αποτελούν τη μοναδική κλινική εκδήλωση της CVID στο 30% περίπου των περιπτώσεων. Στους υπόλοιπους ασθενείς, την κλινική πορεία της νόσου, εκτός από τις λοιμώξεις, χαρακτηρίζει η εμφάνιση μιας ποικιλίας φλεγμονωδών ή και αυτοάνοσων διαταραχών. Στις περιπτώσεις αυτές, η CVID αντιμετωπίζεται με τη χρήση κάθε φορά άλλου βαθμού ανοσοκατασταλτικής θεραπείας, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο έως και πολλές φορές ανέφικτο να γίνει σωστή πρόγνωση της νόσου.

Η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια είναι μια παθολογική κατάσταση κατά την οποία οι ασθενείς εμφανίζουν ένα εύρος συμπτωμάτων τα οποία έχουν κοινό στοιχείο την σημαντική ελάττωση της συγκέντρωσης της IgG στον

ορό που αποτελεί προϋπόθεση για τη διάγνωση της CVID. Στους περισσότερους ασθενείς μειωμένη είναι επίσης και η συγκέντρωση της IgA, ενώ τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης IgM είναι μειωμένα στις μισές περίπου των περιπτώσεων.

Από την περιγραφή της νόσου, προκύπτει ότι η CVID είναι πολυπαραγοντική νόσος και ως εκ τούτου δεν έχουν ενοχοποιηθεί γενετικοί παράγοντες ή άλλοι βιοδείκτες, οι οποίοι μπορούν να υποστηρίξουν τη διάγνωση της CVID. Έτσι η CVID συνεχίζει να προσεγγίζεται με διάγνωση εξ αποκλεισμού, για την οποία, όμως, δεν έχουν ακόμη διαμορφωθεί επικυρωμένα κριτήρια. Ο αποκλεισμός που προϋποθέτει η διάγνωση της CVID αφορά στις άλλες σπανιότερες PADs, είτε αυτές είναι οι PADs με «φυσιολογικά» επίπεδα ανοσοσφαιρινών είτε CSR ανεπάρκειες, που επίσης μπορούν να εμφανιστούν κατά την ενήλικη ζωή όπως και η CVID. Για τις CSR ανεπάρκειες απαιτείται ο προσδιορισμός γενετικών παραγόντων προκειμένου να διενεργείται συγκεκριμένη σειρά γενετικών δοκιμασιών, οι οποίες θα προσδιορίζουν τις CSR ανεπάρκειες μέσα από το πλήθος των PADs, όπως επίσης και άλλων γενετικών παραγόντων που θα καθορίζουν την παρουσία της CVID¹.

Έως τώρα, η CVID είναι μία νόσος η οποία αντιμετωπίζεται με την ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρινών πράγμα το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αποτελεσματική βελτίωση της εικόνας της νόσου. Αυτή η θεραπεία εφαρμόζεται γενικά σε ασθενείς των PADs. Ωστόσο η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία για τις PADs εμφανίζει κλινική εικόνα της CVID. Έτσι η ανίχνευση γενετικών παραγόντων, που μπορούν είτε να χαρακτηρίζουν την ύπαρξη της CVID είτε να την αποκλείουν, είναι ικανή να παρέχει στοιχεία για την ύπαρξη άλλης ανοσοανεπάρκειας.

1.13 ΥΠΟΘΕΣΗ

Τα γονίδια AID και CD40 έχουν συσχετισθεί με τα σύνδρομα HIGM2 και HIGM3 αντίστοιχα^{6,10}. Τα σύνδρομα αυτά εμφανίζονται όταν υπάρχουν μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά, που μειώνουν την λειτουργία σε απόλυτο ή σε πολύ μεγάλο βαθμό. Επίσης τα σύνδρομα αυτά κατατάσσονται στις πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες (PADs). Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών των PADs πάσχουν από κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID) μία πολυπαραγοντική παθολογική κατάσταση για την οποία μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποιος γενετικός παράγοντας που να ευθύνεται για την εμφάνισή της¹.

Στη συγκεκριμένη μελέτη προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε παθολογικές μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς των γονιδίων AID και CD40 σε ασθενείς με CVID, με σκοπό τον εντοπισμό των ασθενών αυτών και την

καθεξής κατάταξη αυτών και μελλοντικών ασθενών, στους ασθενείς με σύνδρομο HIGM2 ή HIGM3 και τον εμπλουτισμό της διαγνωστικής διαδικασίας της CVID με γενετικούς παράγοντες οι οποίοι δεν έχουν δοκιμασθεί στο παρελθόν.

Η ανίχνευση παθολογικών μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών των γονιδίων AID και CD40 σε ασθενείς με CVID θα δώσει μία σαφή εικόνα για τον σχηματισμό της πολύπλοκης κλινικής εικόνας της νόσου. Η εμπλοκή ή ο αποκλεισμός των AID και CD40, που μέχρι πρότινος είναι άγνωστο αν επιτελούν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση της CVID, είναι κομβικό σημείο για την καταπολέμηση της CVID μέσω της σωστής κατάταξης των ασθενών με βάσει τα γονίδια των συνδρόμων HIGM2/HIGM3. Επίσης παρέχονται πληροφορίες για το αν η CVID έχει ασθενείς με γενετικό υπόβαθρο, με βάση το οποίο μπορούν να καταταχθούν σε κάποιο ήδη ταυτοποιημένο με γενετικούς παράγοντες νόσημα, όπως το HIGM2 ή το HIGM3.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Η ομάδα ασθενών που επιλέχθηκε είναι ασθενείς διαγνωσμένοι με CVID. Ο αριθμός αυτών ήταν 5. Επιλέχθηκαν γιατί είχαν κοινή κλινική εικόνα με ασθενείς με Hyper-IgM σύνδρομο, σε σχέση με το σύνολο των διαγνωσμένων με CVID. Οι ασθενείς αυτοί είχαν μετρήσιμες τιμές IgM στον ορό του αίματος, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους ασθενείς CVID που είχαν μηδενικές τιμές. Βασικό χαρακτηριστικό των ασθενών με HIGM σύνδρομο είναι οι φυσιολογικές ή αυξημένες τιμές IgM και οι μηδενικές IgA και IgG στον ορό.

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Η διαδικασία απομόνωσης DNA που ακολουθήσαμε ήταν η διαδικασία με την χρήση στηλών που δεσμεύουν και συγκεντρώνουν το DNA σε τελικό διάλυμα αιθανόλης (PureLink Genomic DNA, Invitrogen). Το αίμα απομονώθηκε από τον ασθενή σε φιαλίδιο 10mL στα τοιχώματα του οποίου υπήρχε επίστρωση ηπαρίνης. Στη συνέχεια ποσότητα από το αίμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του DNA κάθε ασθενή σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit. Σταδιακά λύνονται τα κύτταρα του αίματος και έπειτα δεσμεύεται το DNA σε στήλες, με την βοήθεια διαλυμάτων τα οποία περιέχουν άλατα. Τέλος μετά από διαδοχικές φυγοκεντρήσεις το DNA συγκεντρώνεται σε ένα αποστειρωμένο σωλήνα (1,5mL) σε διάλυμα αιθανόλης. Ακόμη είναι βασικό να αναφερθεί ότι η μέθοδος αυτή επιτρέπει την απομόνωση του DNA

με μεγάλη ακρίβεια και ασφάλεια ως προς την σταθερότητα του γενετικού υλικού μετά την απομόνωση.

Πίνακας 1	Forward	Reverse
AID 1 EXON	5'- TTT GAA TGT GAA GGG CCA AT - 3'	5'- CTC TGA GAG GAA GGC CAG TG - 3'
AID 2 EXON	5'- AGC CAG CAG AGG AAG TCA GA - 3'	5' - TGC TTT TAG AGC CAC CTG CT - 3'
AID 3 EXON	5'-CCA GAG CCG CAA TAA AAG TC - 3'	5' -ACT TCT TCC CCT CGA GCT TC - 3'
AID 4-5 EXONS	5'-CCC CGA GGA AAT GAG AAA AT - 3'	5' -CCA GTA GGG GAC AAT GTT GC - 3'

Πίνακας 2	Forward	Reverse
CD40 1 EXON	5'-ATA GGT GGA CCG CGA TTG GT- 3'	5' -TCC CAA CTC CCG TCT GGT- 3'
CD40 2-3 EXONS	5'-GCT GAA GAA GTT GCA ACG GA- 3'	5' -AAT GGCT GCA TTG TCG GGA- 3'
CD40 4-5 EXONS	5'-GAG GAA GAA AGA GCA GGC AAT- 3'	5' -CCA CTCT GCA GAT GCT TCAC 3'
CD40 6 EXON	5' -ACC TTC CTA GGC TTT CTC CA- 3'	5' -ACC TTC CTA GGC TTT CTC CA- 3'
CD40 7-8-9 EXONS	5'-GTA GGG AGA AAC TGC AGG T- 3'	5' -CTC TCT GGC CAA CTG CCT- 3'

2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

2.3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ PCR

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων απαιτούσε την ενίσχυση των λειτουργικών περιοχών των γονιδίων, περιοχών από τις οποίες εξαρτάται η παραγωγή των λειτουργικών πρωτεϊνών AID και CD40.



Σχήμα 3: Η συνθήκες των αντιδράσεων PCR των εξονίων του γονιδίου AID.

Το AID αποτελείται από 5 εξόνια συνολικά τα οποία ενισχύσαμε με εκκινητές που σχεδιάσαμε (Πίνακας 1). Αρχικά έγινε η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης PCR (Πίνακες 3,4,5) σε δείγμα υγιούς ατόμου (Σχήμα3). Έπειτα από την πραγματοποίηση της βελτιστοποίησης των

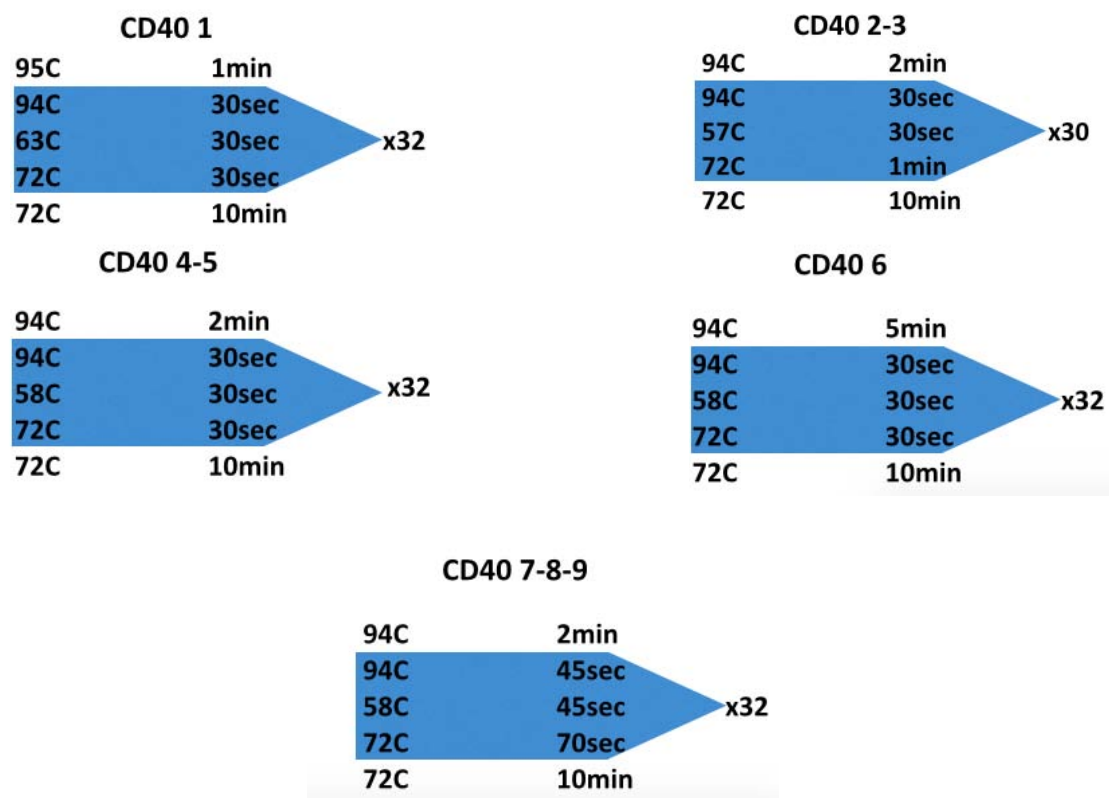
Πίνακας 3 PCR Mastermix		
REAGENT	VOLUME (μL)	
Ultrapure water	225	
MyTaq 5xReaction Buffer	96	
Forward primer (20pmol)	17	
Reverse primer (20pmol)	17	

Πίνακας 4 TaqMix		
REAGENT	VOLUME (μL)	
MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline)	50	
dH ₂ O	2.2	

Πίνακας 5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR		
	Sample	Blanc
PCR Mastermix	22μL	22μL
TaqMix	6μL	6μL
DNA	2μL	-
dH ₂ O	-	2μL

συνθηκών εξετάστηκαν τα δείγματα των ασθενών. Συγκεκριμένα τα εξόνια 1, 2 και 3 ενισχύθηκαν χωριστά ενώ τα εξόνια 4-5 ενισχύθηκαν με μία αντίδραση.

Το γονίδιο CD40 αποτελείται από 9 εξόνια, κάποια προκειμένου να μελετηθούν ομαδοποιήθηκαν επίσης λόγω της μικρής απόστασης που έχουν μεταξύ τους. Κατά την μελέτη του γονιδίου CD40 σε ασθενείς με COVID ενισχύθηκαν και αλληλουχήθηκαν οι εξονικές περιοχές του. Όπως και στο AID έτσι και στην μελέτη του CD40 χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενίσχυαν εκτός από τα εξόνια, τις περιοχές πριν και μετά από τα εξόνια. Επίσης οι εκκινητές στις περιπτώσεις των εξονίων 2-3, 4-5, 7-8-9 επιλέχθηκαν έτσι ώστε να ενισχύουν την κάθε ομάδα εξονίων μαζί, με αποτέλεσμα να ενισχύονται μαζί και τα ιντρόνια που εμπεριέχονται στις θέσεις αυτές. Έτσι τα ιντρόνια 2-3, 4-5, 7-8 και 8-9 έχουν ενισχυθεί και αυτά (Εικόνα 8, Πίνακας 2, Σχήμα 4).



Σχήμα 4: Η συνθήκες των αντιδράσεων PCR των εξονίων του γονιδίου CD40.

2.3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Τα προϊόντα της PCR των ενισχυμένων γονιδίων επαληθεύτηκαν από την ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας των προϊόντων σε gel αгарόζης 2% (Πίνακας 6), με την εμφάνιση μπαντών στο απαιτούμενο μέγεθος. Στην συνέχεια η μέθοδος ανίχνευσης των μεταλλάξεων απαιτούσε τον καθαρισμό των προϊόντων της κάθε αντίδρασης PCR προκειμένου να υπάρχει η μέγιστη

ποιότητα προϊόντος προκείμενου να πραγματοποιηθεί με την σειρά της η αλληλούχιση με μέγιστη ακρίβεια. Ο καθαρισμός των προϊόντων έγινε με την χρήση στηλών (Invitrogen, PureLink PCR purification kit) μέσω των οποίων απομονωνόταν το καθαρό προϊόν της PCR από τα παραπροϊόντα της αντίδρασης.

Πίνακας 6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	
REAGENT	QUANTITY (gr/mL)
UltraPure™ Agarose Invitrogen	2gr
1xTBE (Invitrogen)	100mL

2.3.3 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΒΑΣΕΩΝ (sequencing)

Επόμενο στάδιο της ανίχνευσης είναι η αλληλούχιση βάσεων. Η αλληλούχιση των προϊόντων των αντιδράσεων PCR παρείχε την τελική ξεκάθαρη εικόνα για την ύπαρξη μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στις περιοχές των εξονίων. Τέλος ο σχεδιασμός των εκκινητών επέτρεπε την ενίσχυση περιοχών του DNA λίγο πριν και μετά από την αρχή και το τέλος των εξονίων (OligoPerfect™ Designer, Lifetechologies). Το στοιχείο αυτό επιτρέπει να ανιχνεύσουμε και στις περιοχές αυτές τυχόν μεταλλάξεις.

2.3.4 ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΠΕΨΗ NcoI (RFLP)

Τα περιοριστικά ένζυμα έχουν ως βασική ιδιότητά τους να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA και να προκαλούν θραύσεις στο δίκλωνο DNA. Το NcoI είναι ένα ένζυμο περιορισμού και αναγνωρίζει μία αλληλουχία που σχηματίζεται στον φυσιολογικό φαινότυπο και έτσι πέπτει το προϊόν της PCR ενώ δεν αναγνωρίζει την αλληλουχία στο παθολογικό αλληλόμορφο. Έτσι είναι εφικτό με περιοριστική πέψη του DNA ασθενών να ανιχνεύσουμε την ύπαρξη του πολυμορφισμού αυτού.

Πίνακας 7 NcoI mix	
REAGENT	VOLUME (μL)
dH ₂ O	150
CutSmart Buffer 10x	30
NcoI enzyme	5

Πίνακας 8 ΠΕΨΗ NcoI	
REAGENT	VOLUME (μL)
NcoI mix	9
PCR product	6

Συγκεκριμένα το ένζυμο αυτό χρησιμοποιήθηκε στην ανίχνευση του πολυμορφισμού rs1883832 του γονιδίου CD40. Στην απουσία του παθολογικού αλληλομόρφου (T) σχηματίζεται η αλληλουχία πέψης του NcoI (CCATGG) (Εικόνα 9). Αφού προετοιμάσουμε το ένζυμο με τα κατάλληλα διαλύματα (buffer) και επωάζοντας το προϊόν PCR για 18-24 ώρες (overnight incubation) στις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου (37°C) (Πίνακες 7,8), ηλεκτροφορούμε. Στην ηλεκτροφόρηση εμφανίζονται είτε μία μπάντα αν ο ασθενής είναι ομόζυγος για το παθολογικό (T) αλληλόμορφο είτε μπάντες δύο μεγεθών αν ο ασθενής είναι ομόζυγος για το μη παθολογικό (C) αλληλόμορφο είτε τρεις αν είναι ετερόζυγος (T/C) (Εικόνα 10).

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

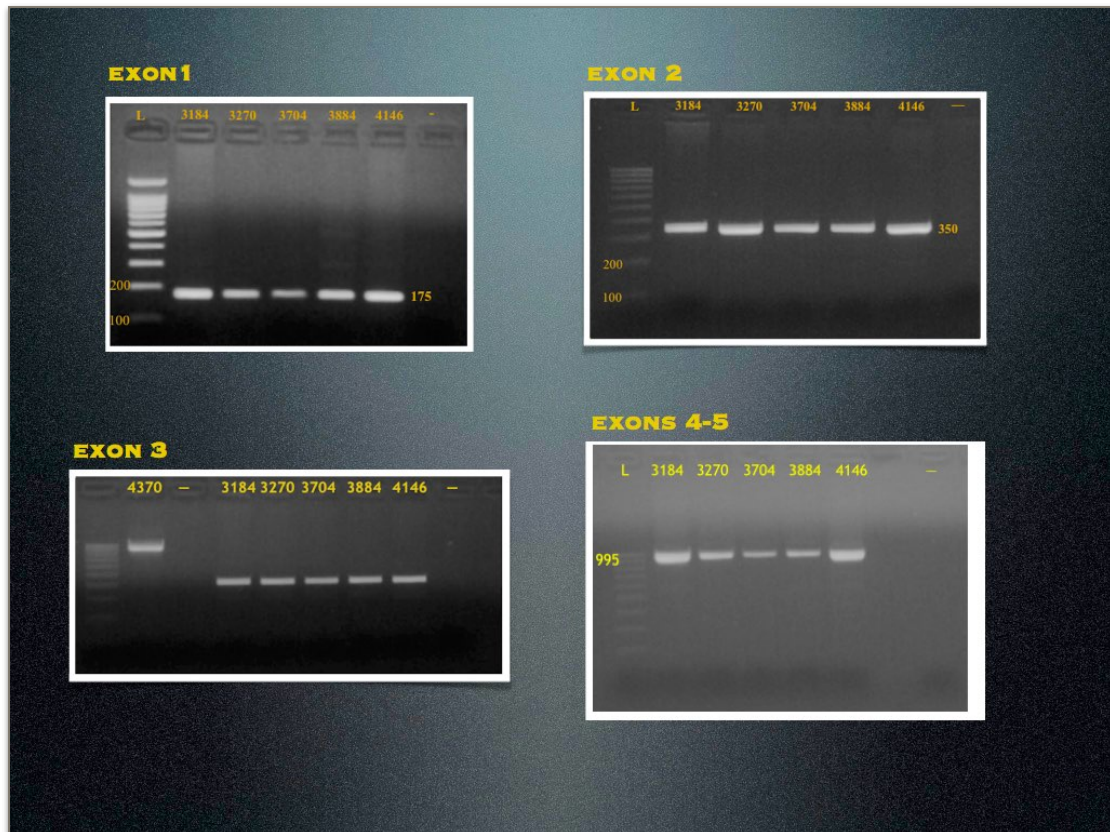
3.1 AID

Μελετήθηκαν 5 ασθενείς με CVID για μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς στις εξονικές περιοχές του γονιδίου AID και σε περιοχές μικρού αριθμού ζευγών βάσεων που βρίσκονταν ανοδικά και καθοδικά των εξονίων.

Αρχικά ενισχύθηκαν όλα τα εξόνια (Εικόνα 6) και στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν. Η αλληλούχιση παρείχε μια σαφή εικόνα του γονιδίου και των εξονίων. Στο σύνολο των εξονίων, δεν ανιχνεύθηκαν πολυμορφισμοί ή μεταλλάξεις. Ωστόσο η ανάλυση των ιντρονικών περιοχών εκατέρωθεν των εξονίων ανέδειξε την παρουσία δύο πολυμορφισμών.

3.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ AID

Οι θέσεις των πολυμορφισμών βρίσκονται εκτός των εξονικών περιοχών. Ο ένας εκ των δύο που μελετήθηκε βρίσκεται σε θέση η οποία είναι καθοδικά από το εξόνιο 4. Δεκαέξι (16) βάσεις από το τέλος του εξονίου 4 με προσανατολισμό 5'-3' όπου εντοπίζεται μια γουανίνη (G) στο φυσιολογικό



Εικόνα 6: Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR του γονιδίου AID. Τα εξόνια 1,2 και 3 ενισχύθηκαν ξεχωριστά. Τα εξόνια 4-5 ενισχύθηκαν σε ζευγάρι. Στην εικόνα εντοπίζονται τα μεγέθη των προϊόντων αυτών.

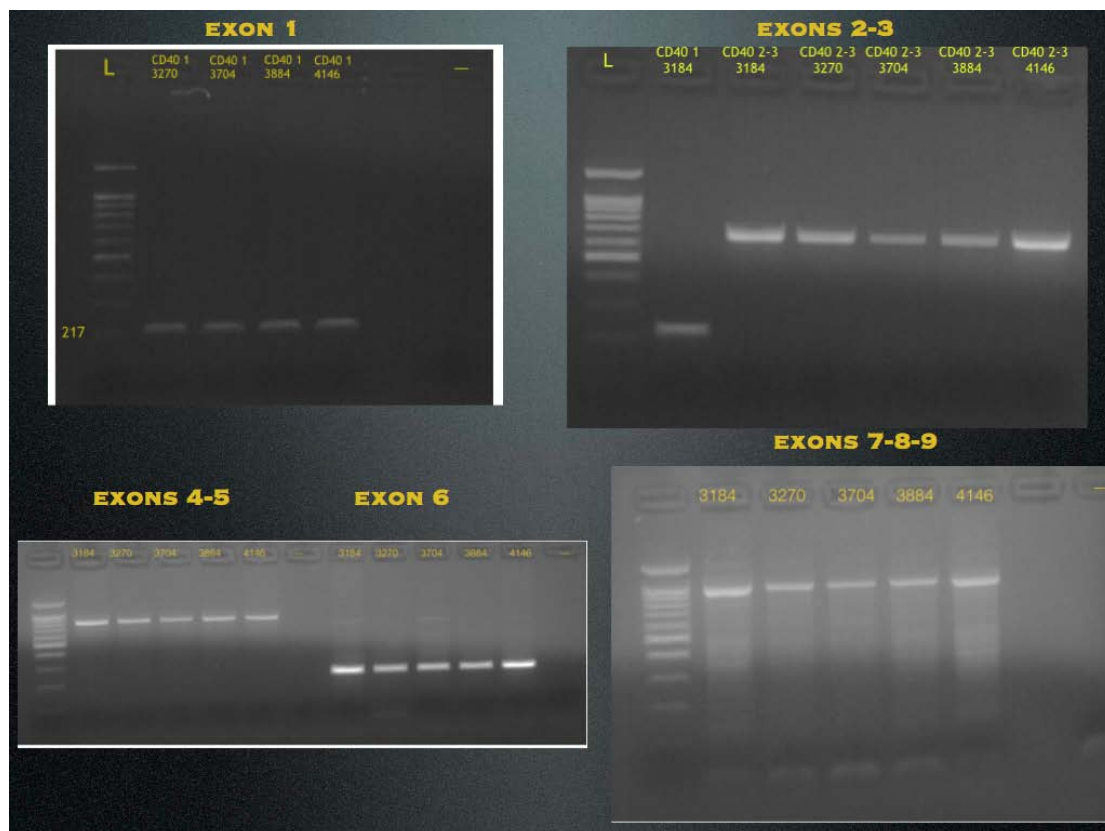


Εικόνα 7: Εικόνα από την αλληλούχιση -αριστερά- η εικόνα από τον πολυμορφισμό g.10998G>A, c.156+16G>A, rs2518144. -δεξιά- η εικόνα από τον πολυμορφισμό g.13652A>C, c.*89A>C rs110946.

πληθυσμό. Στα άτομα που εμφανίζουν πολυμορφισμό σε αυτήν τη θέση η G αντικαθίσταται με A (g.10998G>A, c.156+16 G>A, rs2518144)(Εικόνα 7). Ένα εκ των δειγμάτων που αναλύθηκαν έχει τον πολυμορφισμό σε ομόζυγη κατάσταση ενώ υπήρχαν δύο δείγματα με ετερόζυγα αλληλόμορφα γονίδια. Οι εναπομείναντες δύο ασθενείς είχαν σε ομόζυγη μορφή το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Ο δεύτερος πολυμορφισμός που ανιχνεύσαμε εντοπίζεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Στη θέση αυτή υπάρχει στο γενικό πληθυσμό μια αδενίνη (A) η οποία στον συγκεκριμένο πολυμορφισμό αντικαθίσταται από κυτοσίνη (C) (g.13652A>C, c.*89A>C, rs11046349)(Εικόνα 7). Ένας από τους ασθενείς εμφάνισε τον εν λόγω πολυμορφισμό σε ετερόζυγη μορφή.

3.3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ CD40

Το γονίδιο CD40 φαίνεται να ευθύνεται για την εμφάνιση του συνδρόμου υπεργαμμασφαιριναιμίας M 3 (HIGM3). Η μελέτη του γονιδίου προϋπέθετε την απομόνωση του DNA από περιφερικό αίμα 5 ασθενών με



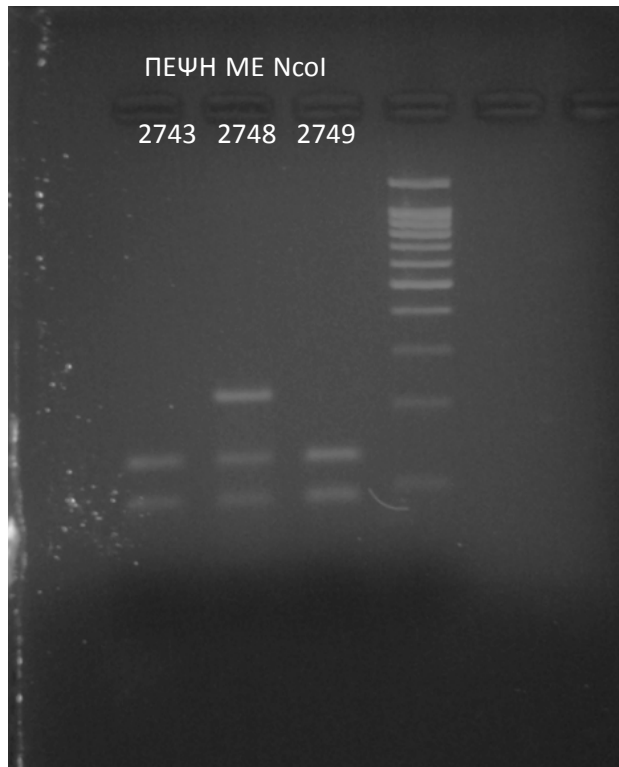
Εικόνα 8: Προϊόντα της αντίδρασης PCR του γονιδίου CD40. -επάνω αριστερά- προϊόν εξονίου 1 από 4 ασθενείς.- επάνω δεξιά- προϊόν εξονίου 1 από έναν ασθενή και προϊόντα εξονίων 2-3 από τους 5 ασθενείς.-κάτω αριστερά- προϊόντα εξονίων 4-5 και 6 από τους 5 ασθενείς-κάτω δεξιά προϊόντα εξονίων 7-8-9 από τους 5 ασθενείς.



Εικόνα 9: Εικόνα από την αλληλούχηση ενός ασθενή με COVID ο οποίος έχει τον πολυμορφισμό g.5077T>C c.-1T>C rs1883832. Η θέση του πολυμορφισμού αυτού είναι η θέση που αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού το NcoI, Η αλληλουχία της θέσης αυτής βρίσκεται στο κάτω δεξιό άκρο της εικόνας.

COVID. Στη συνέχεια βελτιστοποιήθηκαν οι αντιδράσεις για την ενίσχυση των 9 εξονίων του CD40.

Έπειτα από την αλληλούχηση δεν εντοπίστηκε καμία σημαντική μετάλλαξη στην έκταση των εξονίων 2-9 και των ιντρονίων που ενισχύθηκαν μαζί με τα εξόνια. Ωστόσο στο εξόνιο 1 εντοπίστηκε σε έναν από τους ασθενείς ένας πολυμορφισμός σε μία βάση ανοδικά από την αρχή του εξονίου (-1bp). Ο ασθενής ήταν ετερόζυγος για τον πολυμορφισμό αυτό. Στη θέση αυτή μία θυμίνη (T) αντικαθίσταται από μία κυτοσίνη (C) (g.5077T>C, c.-1T>C, rs1883832) με προσανατολισμό 5'-3' (Εικόνα 9). Οι συχνότητες του αλληλομόρφου με βάση την T είναι T=0,248 και την C είναι C=0,752. Αυτές



Εικόνα 10: Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 2% των προϊόντων της περιοριστικής πέψης (RLFP). Ένας από τους τρεις ασθενείς είναι ετερόζυγος για το αλληλόμορφο T, καθώς εμφ-ανίζονται 3 μεγέθη DNA.

είναι οι συχνότητες εμφάνισης των αλληλομόρφων αυτών στον γενικό πληθυσμό.

Η ανίχνευση του αλληλόμορφου αυτού σε ασθενή με CVID μας ώθησε στην διερεύνηση του πολυμορφισμού αυτού σε συγγενικά του άτομα, τα οποία επίσης έπασχαν από CVID και είχαν συμπτώματα που παρέπεμπαν σε Hyper-IgM σύνδρομο. Για τον λόγο αυτό επιλέξαμε να διερευνήσουμε αν στην περιοχή της αλληλουχίας υπάρχει ο συνδυασμός βάσεων που να αναγνωρίζεται από κάποιο ένζυμο περιορισμού, προκειμένου να χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο RFLP. Η αλληλουχία αναγνωρίζεται από το NcoI. Το ένζυμο αυτό δεν πέπτει το T αλληλόμορφο αλλά πέπτει το C αλληλόμορφο (Εικόνα 9).

Απομονώσαμε το DNA των ασθενών και ενισχύσαμε μόνο το εξόνιο 1. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο NcoI για τρεις από τους συγγενείς. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης έδειξε ότι υπάρχει ένα ετερόζυγο συγγενικό άτομο το οποίο έχει τον πολυμορφισμό (Εικόνα 10), καθώς εμφανίζονται μπάντες με μέγεθος ανάλογο των τμημάτων που προκύπτουν από την πέψη.

Όταν υπάρχει ο πολυμορφισμός στον ασθενή με την T αντί της βάσης C το περιοριστικό ένζυμο δεν πέπτει την αλληλουχία του DNA. Συγκεκριμένα το περιοριστικό ένζυμο NcoI πέπτει το αλληλόμορφο με τη βάση C σε ένα μοναδικό σημείο της ενισχυμένης περιοχής. Έτσι στην ηλεκτροφόρηση μετά την περιοριστική πέψη DNA ασθενή που έχει C υπάρχουν σίγουρα δύο τμήματα DNA τα οποία δεν έχουν το ίδιο μέγεθος και έτσι υπάρχουν δύο διαχωρισμένες μπάντες. Στην ηλεκτροφόρηση των αλληλομόρφων με T, στα οποία δεν έχει συμβεί η περιοριστική πέψη και έτσι η αλληλουχία παραμένει αναλλοίωτη, υπάρχει μόνο μία μπάντα σε μέγεθος μεγαλύτερο από τις δύο μπάντες των αλληλομόρφων με C. Συγκεκριμένα το άθροισμα των μεγεθών των δύο τμημάτων που προκύπτει μετά την πέψη του C αλληλομόρφου είναι ίσο με το μέγεθος του T αλληλομόρφου.

Στο γονίδιο AID, το οποίο σχετίζεται με την εμφάνιση του συνδρόμου HIGM2, δεν βρέθηκαν παθολογικές μεταλλάξεις στο DNA των εξονίων. Ωστόσο βρέθηκαν σε 3 από τους 5 ασθενείς, δύο πολυμορφισμοί οι οποίοι εντοπίζονται στο ιντρόνιο 4-5 και στην 3' αμετάφραστη περιοχή.

Στην μελέτη του γονιδίου CD40, το οποίο έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση του συνδρόμου HIGM3, βρέθηκε ότι ένας από τους ασθενείς είχε ένα πολυμορφισμό rs1883832 ο οποίος εμφανίστηκε σε συγγενικό του άτομο.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 AID

Το AID είναι ένα από τα πιο σημαντικά γονίδια τα οποία παίρνουν μέρος στην παραγωγή των ώριμων B κυττάρων. Το προϊόν του γονιδίου αυτού προκαλεί μεταλλάξεις στο DNA οδηγώντας συγκεκριμένες αλληλουχίες γονιδίων στον ανασυνδυασμό και στην συνέχεια σε πολλούς συνδυασμούς αμινοξικών αλυσίδων, με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το AID συμβάλλει στην πραγματοποίηση της μετάπτωσης τάξης (CSR) και σωματικής υπερμετάλλαξης (SHM). Το αποτέλεσμα αυτών των διεργασιών είναι η παραγωγή μεγάλης ακρίβειας αντισωμάτων, τα οποία προέρχονται από ένα βασικό είδος ανοσοσφαιρινών. Το είδος αυτό είναι οι ανοσοσφαιρίνες IgM οι οποίες παράγονται από τα B κύτταρα χωρίς να πραγματοποιηθεί η μεταστροφή τάξης. Μετά από τις διαδικασίες των ανασυνδυασμών προκύπτουν οι ανοσοσφαιρίνες με δομή IgA, IgE, IgG και IgD. Υπάρχουν πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης σε απόλυτο βαθμό αλλά και μερικώς.

Στη παρούσα μελέτη επικεντρωθήκαμε στην ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών οι οποίοι έχουν θέσεις μέσα στα εξόνια. Η επιλογή να εστιάσουμε στις εξονικές περιοχές έγινε με γνώμονα, ότι οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί σε εξονικές περιοχές οδηγούν στην παραγωγή των μη λειτουργικών πρωτεϊνών. Επίσης στους υπό μελέτη ασθενείς θεωρήθηκε ότι είναι πιθανό να υπάρχουν παθολογικοί πολυμορφισμοί οι οποίοι συμβάλλουν στην παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης και κατ' επέκταση να συμβάλλουν στην εκδήλωση της CVID.

Η ανάλυση με την βοήθεια της αλληλούχησης βάσεων δεν ανέδειξε την ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο AID. Ωστόσο η μελέτη των περιοχών αυτών με τεχνικές αλληλούχησης απαιτούν την ενίσχυση των ευρύτερων περιοχών των εξονίων με αντιδράσεις PCR. Έτσι ανιχνεύσαμε δύο πολυμορφισμούς σε περιοχές ιντρονίων. Οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν έχουν εντοπισθεί επίσης σε άλλες ασθένειες είτε μεμονωμένοι είτε και σε συνδυασμό.

Συγκεκριμένα οι δύο πολυμορφισμοί (rs2518144, rs11046349) έχουν εντοπισθεί σε ασθενείς με ανεπάρκεια της ανοσοσφαιρίνης IgE¹⁵. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από την ολοκληρωτική ανεπάρκεια της παραγωγής των ανοσοσφαιρινών IgE λόγω ανικανότητας των Β κυττάρων να παράγουν ειδικές ανοσοσφαιρίνες, πάθηση που είναι αρκετά πιθανό να έχει κοινή βάση με το HIGM2 σύνδρομο το οποίο οφείλεται στην ανεπάρκεια της λειτουργίας του γονιδίου AID.

Μια ενδεικτική μελέτη τονίζει την πολύπλευρη ικανότητα του AID να συμμετέχει, λόγω της βασικής λειτουργίας του, στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι πολύ πιθανά αίτια για την εμφάνιση καρκίνου του εγκεφάλου στην παιδική ηλικία⁸. Τα αίτια του καρκίνου είναι διαφορετικά σε κάθε είδος καρκίνου. Ωστόσο η παραμικρή απώλεια ρύθμισης της λειτουργίας του γονιδίου AID θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση ή την μείωση της ενεργητικότητας του ενζύμου και επομένως την πρόκληση μεταλλάξεων σε περιοχές του DNA διαφορετικές από εκείνες που είναι προορισμένο να μεταλλάσσει. Έτσι είναι πολύ πιθανό το AID να έχει την ίδια απώλεια ρύθμισης της λειτουργίας του και να έχει προκαλέσει μεταλλάξεις σε γονίδια που ευθύνονται για την εμφάνιση του καρκίνου του εγκεφάλου.

Οι δύο πολυμορφισμοί του AID που ανιχνεύθηκαν είναι ικανοί να αλλοιώσουν την λειτουργία του και επομένως πιθανότατα να συμβάλουν στην εμφάνιση του τύπου HIGM2, πράγμα το οποίο θέλει περαιτέρω διερεύνηση καθώς δεν έχουν συσχετισθεί ευθέως με την εμφάνιση του Hyper-IgM 2 συνδρόμου. Η ύπαρξη των πολυμορφισμών αυτών σε ασθενείς με CVID δεν είναι αρκετή για να μας υποδείξει ότι είναι πιθανό το AID να συμβάλλει ως ένα βαθμό στην συνολική εκδήλωση της νόσου CVID.

4.2 CD40

Το CD40 αποτελεί ένα από τα μόρια κλειδί για την ενεργοποίηση και την ωρίμανση των Β κυττάρων. Το μόριο αυτό έχει την θέση του στην επιφάνεια των Β κυττάρων και αποτελεί τον υποδοχέα ενός εκ των βασικότερων σηματοδοτικών μονοπατιών των Β κύτταρων. Το CD40 και το CD40L που βρίσκεται στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων, συνδέονται κατά την ενεργοποίηση των Β κυττάρων, μετά από την διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης. Η σύνδεση αυτή είναι το βασικό σήμα για την ωρίμανση των Β κυττάρων και την ώθησή τους στις διαδικασίες κλωνικής επέκτασης και μετάπτωσης τάξης (ισοτυπική μεταστροφή).

Η μελέτη του CD40 σε ασθενείς με CVID είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση ενός σημαντικού πολυμορφισμού στην Θέση -1 από το πρώτο κωδικόνιο του πρώτου εξονίου του CD40 (rs1883832). Ο πολυμορφισμός αυτός έχει ανιχνευθεί σε πολλές μελέτες που συμπληρώνουν την αρχική υπόθεση που σχηματίσαμε¹⁹. Έχει αποδειχθεί από πολλές μελέτες ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός επηρεάζει ελαφρώς την έκφραση του CD40,

μειώνοντάς την¹⁹. Πιο συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός αυτός ελαττώνει την έκφραση της πρωτεΐνης καθώς επηρεάζεται η 5'αμετάφραστη περιοχή.

Στη συγκεκριμένη μελέτη ο πολυμορφισμός έχει εμφανιστεί μόνο σε ετερόζυγη μορφή. Η πιθανότητα εμφάνισης στην ετερόζυγη κατάσταση στην μελέτη αυτή είναι 25%. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν είναι ιδιαιτέρως σπάνιος για τον πληθυσμό της Ευρώπης καθώς το αλληλόμορφο T εμφανίζεται σε πιθανότητα $P=0,248$.

Οι συγκεκριμένοι ασθενείς με CVID έχουν κλινική εικόνα όμοια με ασθενών με HIGM. Επομένως η εμφάνιση του αλληλομόρφου T, το οποίο προκαλεί την μειωμένη έκφραση του CD40 σε ορισμένες περιπτώσεις, σε ασθενείς με CVID είναι ικανή να επιβεβαιώσει εν μέρη, με κάποιους περιορισμούς, την αρχική μας υπόθεση. Ότι δηλαδή το CD40 θα μπορούσε να αποτελεί έναν αναγνωριστικό γενετικό παράγοντα για να κατατάσσονται καλύτερα οι ασθενείς με CVID.

5. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Στη συγκεκριμένη μελέτη των γονιδίων AID και CD40 παρατηρήσαμε την εμφάνιση τριών πολυμορφισμών, σε 5 ασθενείς. Το μικρό μέγεθος του δείγματος των ασθενών που ελέγξαμε αποτελεί και τον πρώτο περιορισμό. Αρχικά το μέγεθος του δείγματος το οποίο χρησιμοποιήσαμε, 8 συνολικά άτομα για το CD40 και 5 για το AID, δίνει μια ενδεικτική εικόνα για την εμφάνιση και την κατάσταση των γονιδίων στην CVID. Ωστόσο τα αποτελέσματα που είχαμε επιτρέπουν την περαιτέρω ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού ασθενών, προκειμένου να μπορέσουμε να κατατάξουμε με ασφάλεια τους ασθενείς από την CVID σε κάποια από τα σύνδρομα HIGM 2/3, με τελικό σκοπό την καλύτερη αντιμετώπιση της ασθένειας.

Επίσης στην έρευνα αυτή εκτός από την ποσότητα των ασθενών θα πρέπει να προστεθούν και περισσότερα γονίδια τα οποία παρέχουν μία πιο συνολική εικόνα της CVID. Τέτοια γονίδια είναι γονίδια (UNG, APE-1) τα οποία έχουν συσχετισθεί με άλλες αντισωματικές ανεπάρκειες, όπως η HIGM1-4 και γονίδια άλλων συνδρόμων τα οποία εμφανίζουν παραπλήσια κλινική εικόνα και μηχανισμό που προκαλεί την CVID.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Germentis A., Speletas M. Primary antibody deficiencies in adults: A contemporary clinical approach. Archives of Hellenic Medicine 2013 ;30(4): 420-435

2. Aghamohammadi A, Parvaneh N, Rezaei N, et al. Clinical and laboratory findings in Hyper-IgM syndrome with novel CD40L and AICDA mutations. *J Clin Immunol*. 2009;29(6):769-776. doi:10.1007/s10875-009-9315-7.
3. Caratão N, Cortesão CS, Reis PH, et al. A novel activation-induced cytidine deaminase (AID) mutation in Brazilian patients with hyper-IgM type 2 syndrome. *Clin Immunol*. 2013;148(2):279-286. doi:10.1016/j.clim.2013.05.017.
4. Farhadi E, Nemati S, Amirzargar a. a., et al. AICDA single nucleotide polymorphism in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2013;(xx). doi:10.1016/j.aller.2013.02.002.
5. Fear DJ. Mechanisms regulating the targeting and activity of activation induced cytidine deaminase. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(5):619-628. doi:10.1016/j.coi.2013.05.017.
6. Ferrari S, Giliani S, Insalaco a, et al. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(22):12614-12619. doi:10.1073/pnas.221456898.
7. Fiorini C, Jilani S, Losi CG, et al. A novel activation-induced cytidine deaminase gene mutation in a Tunisian family with hyper IgM syndrome. *Eur J Pediatr*. 2004;163(12):704-708. doi:10.1007/s00431-004-1540-8.
8. Heath PT, Okike IO, Oeser C. Hot Topics in Infection and Immunity in Children VIII. *Infect Immun*. 2011;719:11-24. doi:10.1007/978-1-4614-0204-6.
9. Hennig C, Ilginus C, Boztug K, et al. High-content cytometry and transcriptomic biomarker profiling of human B-cell activation. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(1). doi:10.1016/j.jaci.2013.06.047.
10. Keim C, Kazadi D, Rothschild G, Basu U. Regulation of AID, the B-cell genome mutator. *Genes Dev*. 2013;27(1):1-17. doi:10.1101/gad.200014.112.
11. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570-1580. doi:10.1182/blood-2008-02-078071.
12. Lee W-I, Torgerson TR, Schumacher MJ, Yel L, Zhu Q, Ochs HD. Molecular analysis of a large cohort of patients with the hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome. *Blood*. 2005;105(5):1881-1890. doi:10.1182/blood-2003-12-4420.

13. Mandey SHL, Schneiders MS, Koster JÃ, Waterham HR. Mutational Spectrum and Genotype – Phenotype Correlations in Mevalonate Kinase Deficiency. *Hum Mutat.* 2006;27(July):796-802. doi:10.1002/humu.
14. Minegishi Y, Lavoie a, Cunningham-Rundles C, et al. Mutations in activation-induced cytidine deaminase in patients with hyper IgM syndrome. *Clin Immunol.* 2000;97(3):203-210. doi:10.1006/clim.2000.4956.
15. Noguchi E, Shibasaki M, Inudou M, et al. Association between a new polymorphism in the activation-induced cytidine deaminase gene and atopic asthma and the regulation of total serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(3):382-386. doi:10.1067/mai.2001.117456.
16. Quartier P, Bustamante J, Sanal O, et al. Clinical, immunologic and genetic analysis of 29 patients with autosomal recessive hyper-IgM syndrome due to Activation-Induced Cytidine Deaminase deficiency. *Clin Immunol.* 2004;110(1):22-29. doi:10.1016/j.clim.2003.10.007.
17. Revy P, Muto T, Levy Y, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell.* 2000;102(5):565-575. doi:10.1016/S0092-8674(00)00079-9.
18. Watashi K, Liang G, Iwamoto M, et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID). *J Biol Chem.* 2013;288(44):31715-31727. doi:10.1074/jbc.M113.501122.
19. Yun Y, Ma C, Ma X. The SNP rs1883832 in CD40 Gene and Risk of Atherosclerosis in Chinese Population: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2014;9(5):e97289. doi:10.1371/journal.pone.0097289.